

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
**“Национальный исследовательский Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского”**

Институт биологии и биомедицины

Черкасова Е.И.

Брилкина А.А.

РАБОТЫ С КУЛЬТУРАМИ КЛЕТОК

Учебно-методическое пособие

Рекомендовано методической комиссией института биологии и биомедицины,
для аспирантов, обучающихся по направлению подготовки 06.06.01
«Биологические науки», направленности 03.01.02 "Биофизика"

Нижний Новгород

2015

УДК 57.085.23 (075.8)

ББК Е65я73

Ч-48

Ч-48 Черкасова Е.И., Брилкина А.А. РАБОТА С КУЛЬТУРАМИ КЛЕТОК
/ Учебно-методическое пособие. – Нижний Новгород: Издательство
Нижегородского университета, 2015. – 57 с.

Учебно-методическое пособие предназначено для аспирантов, начинающих работать с культурами клеток. В разделе «Теоретическая часть» приведены основные понятия, определения необходимые для начала работы с клеточными культурами.

В разделе «Практическая часть» представлено описание лабораторных работ, включая материалы и оборудование с их характеристиками, необходимых манипуляций при работе с клеточными культурами.

Пособие предназначено для аспирантов ИББМ, изучающих дисциплину «Клеточные технологии».

Рецензент:

Ответственный за выпуск:

председатель методической комиссии Института биологии и
биомедицины ННГУ д.п.н., профессор И.М. Швец

УДК 57.085.23 (075.8)

ББК Е65я73

© Е.И. Черкасова,

А.А. Брилкина,

© Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского, 2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | стр. |
|--|------|
| ВВЕДЕНИЕ | 4 |
| ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ | 5 |
| Основные понятия и преимущества метода культуры эукариотических клеток животных | 5 |
| Понятие клеточной линии | 8 |
| ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ | 14 |
| Лабораторная работа 1. Основные принципы работы с культурами клеток: культуральное помещение и оборудование | 14 |
| Лабораторная работа 2. Реактивы и культуральная посуда | 18 |
| Лабораторная работа 3. Приготовление полной ростовой среды и основных растворов для субкультивирования клеточных культур | 23 |
| Лабораторная работа 4. Субкультивирование адгезивной культуры клеток | 29 |
| Лабораторная работа 5. Методы окраски клеточной культуры | 37 |
| Лабораторная работа 6. Клонирование клеток | 50 |
| РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА | 56 |

ВВЕДЕНИЕ

В учебно-методическом пособии «Работы с культурами клеток» содержатся необходимые сведения для аспирантов, изучающих курс «Клеточные технологии», для выполнения исследований с использованием культур клеток животных. В процессе ознакомления с пособием аспиранты получают начальные теоретические знания и осваивают основные общепринятые методы работ с клетками в культуре *in vitro*.

В практической части аспиранты выполняют такие работы как планирование помещения культурального бокса, знакомятся с используемыми реактивами и культуральной посудой, готовят питательную среду для клеток и пересаживают клетки, окрашивают клетки прижизненными и фиксирующими красителями, получают моноклональную линию клеток.

По окончании практикума аспиранты должны владеть основными приемами работы с клетками животных в культуре *in vitro* и использовать их в своей научно-исследовательской работе.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Основные понятия и преимущества метода культуры эукариотических клеток животных

Техника культуры ткани была разработана для изучения свойств живых клеток, свободных от системных влияний, возникающих *in vivo*. Р.Я. Фрешни (2010) предлагает следующую классификацию понятий, относящихся к определению «культура ткани» (таблица 1).

Таблица 1

Основные понятия, относящиеся к определению «культура ткани»
(Фрешни, 2010)

| КУЛЬТУРА ТКАНИ – метод длительного сохранения и выращивания в специальных питательных средах клеток, тканей, небольших органов или их частей, выделенных из организма человека, животных и растений | |
|--|--|
| Получают без разрушения ткани | Получают при разрушении ткани |
| ОРГАННАЯ КУЛЬТУРА – это структура незагрехированной ткани, которая сохраняет полностью или частично все особенности ткани в живом организме | КЛЕТОЧНАЯ КУЛЬТУРА – это культура, полученная в результате разрушения до единичных клеток (ферментативного, механического, химического) исходной ткани. |
| | ГИСТОТИПИЧЕСКАЯ КУЛЬТУРА – 3-х мерная структура, искусственно сформированная исследователем из одной клеточной культуры. |
| | ОРГАНОТИПИЧЕСКАЯ КУЛЬТУРА – 3-х мерная структура, искусственно сформированная исследователем из нескольких клеточных культур. |

Метод культуры тканей имеет свои преимущества и недостатки (таблица 2).

Преимущества и недостатки метода культуры тканей (Фрешни, 2010)

| Категория | Преимущества | Недостатки |
|--------------------------------------|---|---|
| Физико-химические свойства окружения | Контроль рН, температуры, осмотического давления | Строго асептические условия |
| Физиологические свойства | Контроль концентрации питательных и биологически активных веществ | Строгое поддержание условий культивирования |
| | регуляция межклеточных взаимодействий (введение матриксов) | |
| Биологические свойства | Однородность клеточных линий | Нестабильность клеточных линий |
| | Легкоосуществимая характеристика клеточных линий | Поддержание клеток в состоянии дифференцировки |
| | Криохраниение | Возможность контаминации другими клеточными линиями |
| | Повторяемость и воспроизводимость результатов | |
| Экономика процессов | Сертификация и аккредитация любой клеточной линии | Высокая стоимость реагентов |
| | Экономия реагентов | |
| | Контроль концентрации и времени | |
| | Механизация процесса | |

Поведение клеток в культуре тканей и *in vivo* отличается, основные отличия культуры *in vitro* представлены в таблице 3. Перечисленные основные несовпадения между жизнедеятельностью клеток в ткани и *in vitro* в определенных случаях служат преградой к получению достоверных

результатов, но многие специфические функции клеток можно воспроизводить в культуре, поэтому культуры клеток на настоящий момент являются ценным инструментом исследований.

Таблица 3

Основные отличия культуры *in vitro* (Фрешни, 2010)

| Категория | Культура <i>in vivo</i> | Культура <i>in vitro</i> | Способы решения проблемы <i>in vitro</i> |
|--|--|---|--|
| Пространственная организация клеток | Трехмерная геометрия ткани, специфические межклеточные взаимодействия | Двумерная геометрия, клетки более подвижны, пролиферация ускорена | Использование скаффолдов-подложек |
| Системные компоненты регуляции гомеостаза <i>in vivo</i> | Присутствуют в достаточном количестве, особенно – компоненты нейро-гуморальной системы | Отсутствуют | Введение недостающих компонентов в питательные среды |

Существует множество типов исследований, в которых могут быть использованы культуры тканей:

- 1) исследование внутриклеточных процессов (репликация и транскрипция ДНК, синтез белка, энергетический метаболизм, метаболизм лекарственных веществ);
- 2) внутриклеточные потоки веществ (перемещение гормональных рецепторных комплексов, мембранный транспорт);
- 3) взаимодействие с окружающей средой (питание, инфицирование, цитотоксичность, канцерогенез, действие лекарственных препаратов и лиганд-рецепторное взаимодействие);
- 4) межклеточное взаимодействие (морфогенез, паракринный контроль, кинетика клеточной пролиферации, метаболическая кооперация, клеточная

адгезия и подвижность);

- 5) генетика (геномный анализ в норме и патологии, генетические манипуляции, трансформация и иммортализация);
- б) образование и секреция клеточных продуктов, биотехнология, создание биореакторов, получение конечного продукта, технологии производства и выделения целевого продукта.

Понятие клеточной линии

Источниками клеток для клеточных линий могут быть различные ткани, однако выделяют две основные группы, различающиеся пролиферативным потенциалом: первичные и стволовые клетки.

Первичные клетки – это зрелые клетки определенной ткани. Первичные клетки являются дифференцированными неделяющимися клетками или с крайне низким пролиферативным потенциалом. При культивировании таких клеток *in vitro* возможно проявление тенденции некоторых типов клеток к дедифференцировке при их культивации, в результате которой клетки теряют соответствующий фенотип.

Стволовые клетки – недифференцированные клетки, способные делиться, самообновляться и дифференцироваться в один или более типы специализированных клеток. Различают постнатальные стволовые клетки и эмбриональные стволовые клетки.

Эмбриональные стволовые клетки образуют внутреннюю клеточную массу, или эмбриобласт, на ранней стадии развития эмбриона. Они являются плюрипотентными и не экспрессируют HLA (human leucocyte antigens), то есть не вырабатывают антигены тканевой совместимости.

Постнатальные стволовые клетки (стволовые клетки взрослого организма) – это часть клеток, образовавшихся в результате дифференцировки клеток эмбриона, которые остались не до конца дифференцированными. Ранее

считалось, что эти клетки имеют только олигодифференцировку (монопотентность), но в настоящее время известно, что они могут проявлять значительную степень пластичности. Стволовые клетки взрослого организма можно подразделить на три основных группы: гемопоэтические (кроветворные), мультипотентные мезенхимальные (стромальные) и тканеспецифичные прогениторные клетки.

Наиболее универсальным типом взрослых стволовых клеток и наиболее используемыми в исследованиях и практических применениях являются мезенхимальные стволовые клетки, способные дифференцироваться в клетки нескольких типов: жировые, костные и хрящевые. На процесс и направление дифференцировки МСК оказывают влияние состав среды культивирования, а также физические факторы.

Выделяют три основных типа культур тканей по методу формирования (создания) культур *in vitro* (таблица 4). В эксплантной и клеточной культурах клеточная пролиферация повышена, поэтому присутствует возможность дальнейшего «развития» – формирования клеточных линий, состоящих из клеток одного (преобладающего) вида.

Клеточная линия – это совокупность клеток, полученная из первичной культуры путем увеличения количества клеток после нескольких генераций с преобладанием клеток или линий дифференцировки с высоким темпом роста и высокой однородностью клеточной популяции.

Эволюция любой клеточной линии включает в себя несколько этапов (рис. 1.):

1. Выделение клеток из образца ткани. Методом первичного эксплантата – миграцией клеток из фрагмента ткани и прикрепления их к подходящему субстрату. Методом дезагрегации ткани (механическим, ферментативным или комплексно). К ферментам, используемым для дезагрегации ткани, относятся неочищенные препараты трипсина, коллагеназы, эластаза, проназа, диспаза и другие, которые используют либо по отдельности, либо в комбинации. Для

каждого типа ткани и выделяемых клеток существуют специальные протоколы выделения.

Таблица 4

Основные типы культуры тканей по методу создания (Фрешни, 2010)

| Тип | Метод формирования | Особенности | Возможность формирования постоянных клеточных культур |
|----------------------|---|--|--|
| Органная культура | Культивирование целостных кусочков ткани на границе раздела сред жидкость(питательная среда) - газ | Сохранены структурно-функциональные характеристики ткани, гистологические межклеточные взаимодействия | Отсутствует |
| Эксплантная культура | Культивирование целостных кусочков ткани на границе раздела сред жидкость (питательная среда) – поверхность плотного субстрата для активации миграции клеток из ткани на поверхность субстрата | Характеристики ткани не сохраняются, выделяются мигрирующие клетки (быстро пролиферирующие) | Присутствует |
| Клеточная культура | Механическое или ферментативное разрушение ткани до суспензии клеток, которые затем помещаются на плотную подложку (адгезивные культуры) или в жидкую фазу культуральной среды (суспензионные культуры) | Характеристики ткани не сохраняются, выделяются все клетки, из общей массы которых избирается необходимый тип (путем выбора фермента, последующих манипуляций) | Присутствует |

2. Формирование первичной культуры. Происходит миграция клеток из эксплантата, адгезия клеток разрушенной ткани; клеточная пролиферация. Первичная культура разнородна, в ее составе – практически все типы клеток дезагрегированной ткани.

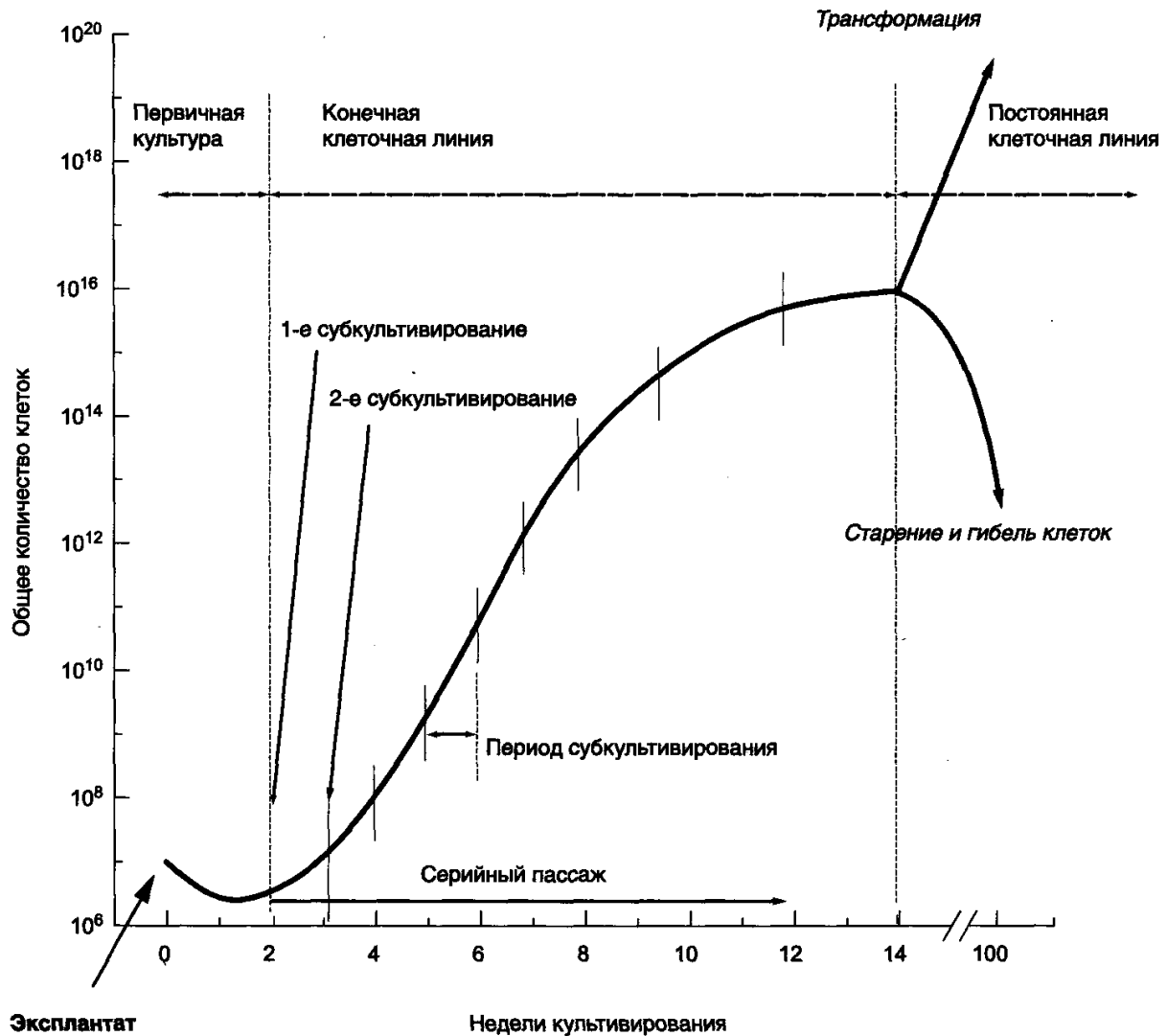


Рис. 1 Развитие клеточной линии (Фрешни, 2010)

3. Первая субкультура клеточной линии. Как только первичная культура пересеяна (спассажирована) в другой культуральный флакон – она называется клеточной линией. Субкультивирование (пассаж) – процесс посева культуры или ее части в другой культуральный флакон с заменой среды культивирования.

4. Поддержание клеточной линии (пассаж). Повторяется определенное количество раз через 3-10 дней. При ведении культуры крайне важно записывать номер пассажа – то количество раз, которое культура была пересеяна. Генерация – количество удвоения клеток, которому подверглась культура. В случае непролиферирующей (слабопролиферирующей) культуры замена среды также необходима.

5. Старение или трансформация. Старение – генетически детерминированное событие, приводящее к гибели клеток после определенного числа удвоений (генераций). Большинство нормальных клеток имеют конечный срок жизни продолжительностью в 20-100 генераций. С клеточным старением связано понятие «Предел или лимит Хейфлика» (Hayflick limit) – граница количества делений соматических клеток, которые умирают приблизительно после 50 делений и проявляют признаки старения при приближении к этой границе. Для большинства человеческих клеток предел Хейфлика составляет 52 деления.

Некоторые клеточные линии могут давать начало постоянным (**иммортализованным**) клеточным линиям. Изменение в культуре, приводящее к возникновению иммортализованной клеточной линии, называют трансформацией, – оно возникает спонтанно или индуцируется химически или вирусом. Постоянные клеточные линии обычно анеуплоидны и имеют хромосомный набор между диплоидным и тетраплоидным, имеются вариации в хромосомном наборе и составе между клетками одной популяции (анеуплоидия). К свойствам постоянных клеточных линий относятся также снижение потребности в сыворотке, уменьшение ограничения роста клеточной плотностью, рост на полужидкой среде.

Для исследований в определенных областях предпочтительнее постоянные клеточные линии, которые тщательно охарактеризованы и используются в исследованиях данного типа определенный временной промежуток, что повышает достоверность и сравнимость результатов для исследователей по всему миру. В России существует Всесоюзная (Российская)

коллекция клеточных культур, которая была создана в 1978 году. В ее состав входят 9 специализированных коллекций, находящихся в разных городах.

Адреса коллекции в сети Интернет:

http://www.cytspb.rssi.ru/rkkk/rkkk_ru.htm

<http://www.sevin.ru/collections/cells.html>

Основными задачами Российской коллекции клеточных культур являются:

- 1) сбор клеточных линий, включая получение новых культур на базе коллекции для сохранения и расширения генофонда;
- 2) хранение клеточного материала (криоконсервация);
- 3) паспортизация (характеристика клеточных линий, контроль качества);
- 4) депонирование клеточных линий в связи с патентованием;
- 5) создание информационного банка данных по клеточным культурам;
- 6) распространение образцов клеточных линий.

Таким образом, каждая клеточная линия имеет следующие критерии, которые следует учитывать при выборе для исследования: конечная или постоянная, видовая принадлежность, скорость роста, готовность для эксплуатации, фенотипические признаки, стабильность.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Лабораторная работа 1

Основные принципы работы с культурами клеток:

культуральное помещение и оборудование

Цель работы: изучить оснащение бокса для работы с культурами клеток. Познакомиться с методами асептики при работе с культурами клеток.

Теоретическая часть

Главное требование для культивирования клеток – необходимость поддержания асептических условий. Важно, чтобы помещения лаборатории выполняли комплекс минимальных требований:

1. Для работы с клетками существует стерильная зона (бокс), в которой поддерживаются чистота, минимум перемещения людей и нет сквозного прохода.
2. Бокс расположен отдельно от помещений, в которых содержатся животные или ведутся микробиологические работы.
3. Есть подготовительная зона, в которой проводятся нестерильные работы.
4. Есть моечная зона.
5. Есть отдельные зоны для хранения реактивов и жидкостей (при комнатной температуре, $+4^{\circ}\text{C}$ и -20°C), отделения для хранения лабораторного пластика и газовых баллонов.
6. Есть отдельное помещение для стерилизации материалов и посуды.

В стерильной зоне (боксе) обязательно присутствие следующих приборов: CO₂-инкубатора, ламинарно-поточного шкафа, инвертированного микроскопа, центрифуги, холодильника.

Влажный CO₂-инкубатор необходим для дозирования и регулирования таких физических параметров, как влажность, температура, содержание CO₂ в вентилируемом воздухе. Система оснащена датчиками содержания газов (CO₂ и O₂), температуры, влажности, причём измерения осуществляются со строгой периодичностью. Погрешность регулирования концентрации CO₂ достигает 0,1% – это очень малая величина в общем объёме газовой смеси. Большинство инкубаторов поддерживают диапазон значений концентрации углекислого газа 0-20%, кислорода – 0,2-95%. Большинство клеточных культур теплокровных животных и человека культивируются при условиях содержания в атмосфере 5% CO₂, 70% влажности и температуре 37 °С.

Ламинарно-поточный шкаф II класса биологической безопасности. Основная задача ламинарно-поточных шкафов II класса – защита оператора, рабочей зоны и окружающей среды. Принцип работы: очищенный специальными HEPA-фильтрами воздух равномерным вертикальным (ламинарным) потоком опускается внутри рабочей зоны, создавая стерильные условия и удаляется в воздуховод через отверстия в поверхности столешницы. Большая часть воздуха (70%) проходит через основные фильтры и поступает обратно в рабочую зону, осуществляя рециркуляцию. 30% воздуха проходит через выходной HEPA фильтр и выбрасывается в помещение. Эффективность фильтрации составляет 99,9997% для частиц размером 0,3 мкм. Кроме того, шкаф оснащен ультрафиолетовой лампой, которая зажигается на 40 минут до начала работы и на 40 минут после окончания для обеззараживания внутреннего объема шкафа.

Инвертированный микроскоп – это оптический прибор с «перевернутой» конструкцией, которая позволяет вести исследование объекта с его нижней стороны. Объективы микроскопа расположены под исследуемым образцом, осветительный конденсор находится сверху. Микроскопы для работы с культурами клеток обязательно оснащены *системами фазового контраста* – дополнительной функцией, которая позволяет изучать прозрачные объекты без предварительного окрашивания за счет специального конденсора и особо

устроенного объектива, которые регулируют изменения фазы световых волн и превращают разность фаз в разность интенсивностей света, благодаря чему детали строения объекта становятся доступными для глаза. Система колец в конденсоре и объективе отделяет те лучи, которые дифрагмировали (отклонились) на объекте от тех, которые не дифрагмировали. После того как дифрагмировавшие лучи проходят через фазовую пластинку объектива, вносящую дополнительный сдвиг по фазе, они рекомбинируются с недифрагмировавшими лучами. Именно таким образом удается резко повысить контраст клеток или внутриклеточных структур.

Центрифуга с числом оборотов от 200 до 2000-4000 об/мин. Предназначена для осаждения клеток для их концентрирования без покидания помещения бокса (в доступности).

Холодильник, поддерживающий температурные режимы от +2 до +8⁰С и -20⁰С предназначен для хранения основных растворов реактивов без покидания помещения бокса (в доступности).

Присутствие этих приборов в боксе минимизирует возможность контаминации (заражения) клеточных культур из воздуха помещений.

В подготовительной зоне располагаются лабораторные столы, шкафы и навесные полки для хранения расходных материалов, лабораторной посуды, находятся дополнительные приборы для приготовления реактивов и подготовки образцов – термостат, настольная центрифуга, шейкер, аналитические весы, магнитные мешалки.

В помещении для стерилизации лабораторной посуды и материалов находятся: вертикальный паровой стерилизатор с системой управления, шкаф суховоздушный для стерилизации, шкаф для хранения материалов.

Теоретическая часть

Материалы и оборудование

Приборы, находящиеся в лаборатории

Общий план лаборатории в масштабе 1:50

Линейка, карандаш

Выполняемые процедуры

Под руководством преподавателя ознакомиться с комплексом оборудования, находящимся в лаборатории для работы с культурами клеток. Понять предназначение и функциональную нагрузку каждого прибора.

1. Отметить на плане местонахождение предметов основного оборудования в приблизительном масштабе.
2. Обозначить основные зоны работы.
3. Обозначить на плане возможное размещение помещения для криохранилища клеток. Обосновать свой выбор.

Вопросы по теме

1. В каком порядке должны располагаться рабочие зоны в лаборатории для работы с клеточными культурами?
2. Какие основные приборы должны присутствовать в зоне бокса?
3. Какие особенности есть у микроскопа для работы с живыми клеточными культурами?
4. Для чего необходим CO₂-инкубатор?
5. Какие способы асептической обработки применяются в ламинарном шкафу?

Вопросы для самостоятельного изучения

1. Что такое криоконсервация и для чего она применяется?
2. Преимущества и недостатки криоконсервации.

3. Какие типы криохранилищ используются в лабораториях?
4. При какой температуре хранятся клетки в криохранилищах различных типов?
5. Сформулируйте основное правило криозаморозки клеток.

Лабораторная работа 2

Реактивы и культуральная посуда

Цель работы: познакомиться с основными расходными материалами при работе с культурами клеток. Освоить основные приемы асептических методов работы в боксе и ламинарном шкафу.

Теоретическая часть

Культуральная посуда. При работе с клетками необходимо соблюдать методы асептики, поэтому вся культуральная посуда должна быть стерильной. Существует два основных типа лабораторной посуды для работы с культурами клеток: стеклянная и пластиковая (таблица 5). Выбор посуды зависит от материального обеспечения лаборатории и предпочтения исследователя, однако в последнее время популярной стала пластиковая – из-за относительной дешевизны и удобства в использовании.

Весь спектр посуды для работы с клеточными культурами можно разделить на несколько больших групп – в зависимости от выполняемых задач и частоты употребления в рутинной работе. Мы рассмотрим те группы, которые необходимы для пассажирования и криозаморозки клеточных культур (таблица 6).

Следует отметить, что внутри каждой из перечисленных групп в настоящее время существует огромное разнообразие видов и моделей, с

которыми исследователю следует познакомиться самостоятельно перед началом работы.

Таблица 5

Виды посуды для работы с культурами клеток

| Виды | Кратность использования | Стерилизация |
|-------------|--------------------------------|---|
| Стеклоянная | Многоразовая | Требует тщательного мытья и стерилизации после каждого использования |
| Пластиковая | Одноразовая | Не требуется, в случае приобретения стерильной посуды Требуетя, если приобретена нестерильная (например, наконечники для автоматических пипеток) |

Приборы для дозирования жидкости. Существует большой спектр приспособлений и приборов для дозирования жидкостей, которые используются в данных работах – это простые лабораторные груши, полумеханические лабораторные груши, различные виды автоматических дозаторов. Наиболее распространены механические и электрические дозаторы, которые имеют функцию «с возможностью автоклавирования», поскольку для поддержания асептических условий должны автоклавироваться 1 раз в 2-3 месяца.

Средства для подсчета клеток. Подсчет клеток – одна из рутинных процедур, которую выполняет исследователь при работе с клетками. Существует большое разнообразие электрических приборов для подсчета клеток – цитометров, различных по выполняемым функциям и по цене. Также используются камеры Горяева. Камера Горяева – приспособление, предназначенное для подсчета количества клеток в заданном объеме жидкости. Обычно ее используют для определения числа форменных элементов в образце

крови. Представляет собой предметное стекло, с бороздами и нанесённой микроскопической сеткой.

Таблица 6

Основные виды материалов для ведения клеточных культур

| Наименование | Виды | Использование |
|---|---|---|
| Культуральные флаконы | 25 см ² , 75 см ² , 150 см ² , 175 см ² , 225 см ² | Рост клеточных культур |
| Культуральные планшеты | Количество лунок: 96, 48, 24, 12, 6 | Рост клеточных культур, манипуляции с клеточными культурами (проведение экспериментов, клонирование, окраска) |
| Чашки Петри | 35 мм, 60 мм, 90 мм | |
| Пипетки серологические | Различного объема до 25 мл | Отбор жидкостей при манипуляциях |
| Автоматические дозаторы жидкостей с постоянным и переменным объемом | 0,2 мл, 1,0 мл, 5,0 мл, 10 мл | Отбор жидкостей при манипуляциях |
| Пробирки для центрифугирования типа фалькон | 15 мл и 50 мл | Для центрифугирования |
| Пробирки типа эппендорф | 0,5 мл, 1,5 мл, 2,0 мл | Отбор жидкостей при манипуляциях, хранение реактивов до T=-20 ⁰ C |
| Контейнеры для хранения наконечников | Для каждого типа наконечников | Хранение наконечников в асептических условиях |
| Контейнеры для хранения пробирок Эппендорфа | Для каждого типа пробирок Эппендорфа | Хранение |
| Лабораторные пластиковые подставки для пробирок различного диаметра | Для каждого типа пробирок | При работе в ламинарном шкафу |
| Пробирки для замораживания клеток (криопробирки) | 0,5 мл, 1,5 мл, 2,0 мл | Для хранения в криохранилище |

Приборы и материалы, находящиеся в ламинарном шкафу. В ламинарном шкафу должен всегда находиться необходимый минимум материалов и предметов, которые используются в повседневной работе: емкость с 70% спиртом для протирки поверхностей, ватные тампоны в контейнере, контейнеры с наконечниками, дозаторы разного объема, пинцет, горелка. Все предметы, вносимые в ламинарный шкаф, должны протираться ватным тампоном, смоченным 70% спиртом, а края открываемых и закрываемых сосудов – также протираться спиртом и прокаливаться в пламени горелки.

Материалы и оборудование

1. Расходные материалы, находящиеся в лаборатории (культуральные флаконы объема 25 см², 75 см²; центрифужные пробирки).
2. Дозаторы различного объема (0,2 мл, 1,0 мл, 5,0 мл).
3. Наконечники различного объема (0,2 мл, 1,0 мл, 5,0 мл).

Выполняемые процедуры

1. Под руководством преподавателя ознакомиться с расходными материалами, находящимся в лаборатории для работы с культурами клеток. Понять предназначение и функциональную нагрузку материалов.
2. В нестерильных условиях выполнить следующие упражнения:
 - 2.1. При помощи дозатора перенести жидкость из одного флакона в другой, меняя переносимый объем.
 - 2.2. При помощи пинцета открыть культуральные сосуды с разными типами пробок.
 - 2.3. Разместить приборы и материалы, обязательно находящиеся в ламинарном шкафу в рабочем порядке.
 - 2.4. Выполнить комплекс необходимых процедур при начале и завершении работы в ламинаре.

Полученные результаты

1. Записать, какими материалами и приборами пользовались при выполнении упражнения.
2. Записать основные правила асептической работы в боксе и ламинарно-поточном шкафу.
3. Зарисовать расположение присутствующих и вносимых в ламинарно-поточный шкаф предметов.

Вопросы по теме

1. Какой бывает культуральная посуда?
2. Перечислите основные типы материалов, необходимых в рутинной работе с культурами клеток.
3. Как располагаются основные приборы и материалы в ламинарном шкафу?
4. Перечислите основные правила открывания сосудов со стерильными жидкостями в ламинарном шкафу.

Вопросы для самостоятельного изучения

1. Какие типы криопробирок существуют?
2. Расскажите о правилах личной гигиены и личной защиты при работе с клеточными культурами.
3. Опишите основные методы стерилизации (сухой жар, автоклавирование, излучение, химическую обработку и фильтрацию): условия, материалы и ограничения.
4. Каковы правила упаковки стеклянной посуды при стерилизации?

Лабораторная работа 3

Приготовление полной ростовой среды и основных растворов для субкультивирования клеточных культур

Цель работы: применить основные приемы асептических методов работы в боксе и ламинарном шкафу. Подготовить основные индивидуальные растворы для субкультивирования клеток: полной ростовой среды, раствора Версена и раствора трипсина для дальнейшей работы.

Теоретическая часть

Полная ростовая среда – среда, содержащая все среды и добавки и подходящая для использования при выделении или культивировании определенного типа клеток. Ее обычно готовят из среды определенного химического состава с добавлением аминокислот (наиболее часто – глутамина), сыворотки, факторов роста, гормонов, антибиотиков и антимикотиков.

Среда определенного химического состава. В подавляющем большинстве случаев в исследованиях используются готовые коммерческие среды с известным химическим составом, предназначенные для ведения определенных культур клеток. Например, минимальная среда Игла (MEM) используется в качестве основы для множества полных готовых сред. В состав среды входят незаменимые аминокислоты (цистин, цистеин, аргинин, тирозин), витамины (биотин, витамины группы В, холин, фолиевая кислота, инозитол, никотинамид). Соли, входящие в состав среды, обеспечивают осмотическое давление (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} , PO_4^{2-} , HSO_3^-), кроме того Na^+ , K^+ и Cl^- регулируют мембранный потенциал, а SO_4^{2-} , PO_4^{2-} , HSO_3^- выступают в качестве анионов, необходимых в качестве предшественников макромолекул и регуляторов внутриклеточного заряда. Глюкоза входит в состав большинства

сред как источник энергии, ее метаболизм происходит главным образом путем гликолиза.

Аминокислоты. В основном аминокислоты содержатся уже в самих средах определенного химического состава. Большинство стандартных сред определенного химического состава не содержит аминокислоту глутамин, поэтому ее добавляют дополнительно. Однако некоторые клеточные культуры требуют повышенной концентрации аминокислот – тогда отдельно добавляют и их.

Сыворотка. Для большинства клеточных культур используется телячья сыворотка (CS), эбриональная бычья сыворотка (FBS), сыворотка взрослых лошадей и человеческая сыворотки. Сыворотку (жидкую фракцию крови) получают из цельной крови либо путем образования сгустка, либо физическим отделением форменных элементов крови. Основными компонентами сыворотки являются:

- 1) Факторы адгезии (фибронектин);
- 2) Пептиды, регулирующие рост и дифференцировку (основной тромбоцитарный фактор роста – PDGF и небольшое количество других);
- 3) Белки: альбумин (переносчик липидов, минералов), фибронектин (способствует адгезии клеток), макроглобулины (ингибиторы трипсина), трансферрин (связывает железо, делая его менее токсичным и более доступным для клеток), присутствует множество других белков, функции которых еще не выяснены достоверно;
- 4) Питательные компоненты (неорганические соединения, жирные кислоты и их метаболиты, витамины);
- 5) Гормоны (инсулин, гидрокортизон, эстрогены, трийодтиронин), которые регулируют мембранный транспорт, строение клеточной поверхности и фенотип клетки.

Факторы роста. Для лучшей пролиферации клеток в полные питательные среды могут добавляться дополнительные факторы роста, различающиеся по своей специфичности и продающиеся отдельно как коммерческие препараты

рекомбинантных белков (например, фактор роста фибробластов – FGF, эпидермальный фактор роста – EGF, ангиогенин и другие).

Антибиотики и антимикотики добавляют для снижения возможности контаминации (заражения). Однако использование ламинарно-поточковых шкафов и выполнение асептических правил работы делают применение антибиотиков и антимикотиков не обязательным и даже вредным в рутинной работе.

Препараты для снятия клеток с культуральной поверхности. При стандартном пассировании (пересадке) для отмывки клеток от остатков полной ростовой среды после ее удаления применяются буферные растворы различных солей (рН 7,4). Наиболее часто применяются фосфатно-солевой буферный раствор (PBS) и раствор Хенкса. Обработка растворами необходима, поскольку содержащиеся в ростовой среде макроглобулины ингибируют действие дисоциирующих агентов, например трипсина, и снятие клеток без предварительной промывки затрудняется.

Для снятия клеток с культуральной поверхности необходимо разорвать ионные связи, образованные с помощью двухвалентных ионов и пептидные связи, образованные молекулами факторов адгезии, которыми клетки прикрепляются к субстрату.

Первые разрушаются с помощью раствора Версена (натриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты в растворе солей).

Пептидные связи разрушают с помощью ферментных препаратов, наиболее часто применяют 0,25 % раствор фермента трипсина.

Материалы и оборудование

1. Дозаторы различного объема (0,2 мл, 1,0 мл, 5,0 мл)
2. Наконечники различного объема (0,2 мл, 1,0 мл, 5,0 мл)
3. Стерильные стеклянные флаконы объема 50 мл.
4. Основная среда MEM объема 0,45 л (стерильная)

5. Глутамин, 146 мг (стерильный)
6. Бычья сыворотка, фетальная или новорожденного теленка, 20 мл
7. Раствор 0,25% трипсина, 50 мл
8. Раствор Версена или PBS 100 мл
9. Этанол 70%, 0,5 л
10. Пинцеты лабораторные, 2 шт
11. Тампоны ватные
12. Карандаш, блокнот для записей

Выполняемые процедуры

1. Подготовить ламинарно-поточный шкаф к работе, а после выполнения всех упражнений – к выключению, выполнить необходимые асептические процедуры.
2. Приготовить раствор полной ростовой среды, 20 мл, перенести приготовленный раствор в пробирки (стеклянные флаконы) объемом 50 мл.
3. Перенести раствор Версена (или 0,25% раствор трипсина в пробирки (стеклянные флаконы) объемом 50 мл.

Ход работы

- 1.1. Перед началом работы простерилизовать ламинарно-поточный шкаф УФ-излучением в течение 40 минут.
- 1.2. Протереть рабочие поверхности раствором 70% спирта.
- 1.3. Протереть пинцеты раствором 70% спирта.
- 2.1. Поместить в ламинарно-поточный шкаф: основную среду MEM объема 0,45 л, глутамин 146 мг, бычью сыворотку 20 мл.
- 2.2. Протереть поверхности и пробки бутылей 70% спиртом.
- 2.3. Вскрыть при помощи пинцета бутылку с основной средой MEM
- 2.4. Вскрыть при помощи пинцета флакон порошком глутамина

- 2.5. Перенести 1 мл основной среды во флакон с глутамином, тщательно перемешать.
- 2.6. Перенести раствор глутамин в бутылку с основной средой, тщательно перемешать.
- 2.7. Перенести 17,75 мл раствора основной среды с глутамином в центрифужные пробирки (стеклянные флаконы).
- 2.8. Вскрыть при помощи пинцета и скальпеля емкость с сывороткой.
- 2.9. Перенести 2,25 мл сыворотки в пробирки (стеклянные флаконы) с раствором основной среды и глутамин. Перемешать полученный раствор полной ростовой среды.
- 2.10. Закрыть флаконы с приготовленной полной средой, основной средой MEM. Перед закрытием протереть горлышко сосуда и пробку 70% этанолом.
- 3.1. Перенести в ламинарно-поточный шкаф: раствор Версена или PBS, раствор 0,25% трипсин 50 мл.
- 3.2. Протереть поверхности и пробки бутылок 70% спиртом.
- 3.3. Вскрыть емкости при помощи пинцета и скальпеля.
- 3.4. Перенести 20 мл раствора Версена или PBS в отдельную емкость; закрыть крышкой с выполнением необходимых асептических процедур.
- 3.5. Перенести 5 мл раствора трипсин в отдельную емкость; закрыть крышкой с выполнением необходимых асептических процедур.
- 4.1 После завершения выполнения упражнений убрать все лишние материалы из ламинарно-поточного шкафа.
- 4.2 Протереть рабочие поверхности раствором 70% спирта.
- 4.3 Протереть пинцеты раствором 70% спирта.
- 4.4 После окончания работы простерилизовать ламинарно-поточный шкаф УФ-излучением в течение 40 минут.

Полученные результаты

1. Записать правила манипуляции с предметами в асептических условиях ламинарно-поточного шкафа.
2. Записать последовательность действий при приготовлении полной ростовой среды. Рассчитать процентное содержание сыворотки и молярное содержание глутамин в полной ростовой среде.

Вопросы по теме

1. Какой бывает культуральная посуда?
2. Перечислите основные типы материалов, необходимых в рутинной работе с культурами клеток.
3. Как располагаются основные приборы и материалы в ламинарном шкафу?
4. Перечислите основные правила открывания сосудов со стерильными жидкостями в ламинарном шкафу.

Вопросы для самостоятельного изучения

1. Почему в состав большинства стандартных сред не входит аминокислота глутамин и ее приходится добавлять дополнительно?
2. Что такое бессывороточные среды: для чего они применяются, их преимущества и недостатки.
3. Какие антибиотики и антимикотики могут добавляться в полные ростовые среды? В каких случаях их применение оправдано?
4. Перечислите недостатки применения антибиотиков и антимикотиков при культивировании клеток.

Лабораторная работа 4

Субкультивирование адгезивной культуры клеток

Цель работы: закрепить навыки выполнения работ в асептических условиях.

Изучить технику пассирования монослойной культуры клеток и подсчета количества клеток при помощи камеры Горяева.

Теоретическая часть

Большинство культур клеток эпителиального происхождения выращиваются в адгезивном (прикрепленном) состоянии. Адгезия клеток к пластику (стеклу) происходит из-за действия 3-х классов трансмембранных белков: интегринов, молекул межклеточной адгезии и трансмембранных протеогликанов. Для выращивания адгезивных клеток требуется поверхность, на которой имеются шероховатости – поэтому используются стеклянные или пластиковые культуральные флаконы различных модификаций, внутренняя поверхность которых может быть обработана специальным образом. Для улучшения адгезии и стимуляции роста и дифференцировки внутренняя поверхность флакона может покрываться коллагеном или элементами внеклеточного матрикса. В последнее время для выращивания адгезивных клеток тканей животных и человека с целью пространственного формирования будущей ткани, органа или его фрагмента в качестве носителей все чаще используются скаффолды (англ. *scaffold* — леса, подмости) - трехмерные подложки-носители естественного или искусственного происхождения.

Процесс роста адгезивной культуры внутри одного культурального сосуда можно представить в виде стандартного графика (рис. 2). Сразу после посева наступает lag-период, за ним возникает период экспоненциального роста – log-период, в котором клетки активно пролиферируют, истощая среду и занимая все большее пространство культурального флакона. Когда плотность клеток (количество клеток/см² субстрата) достигает уровня, что весь субстрат

оказывается занятым, рост прекращается или значительно снижается (фаза плато).

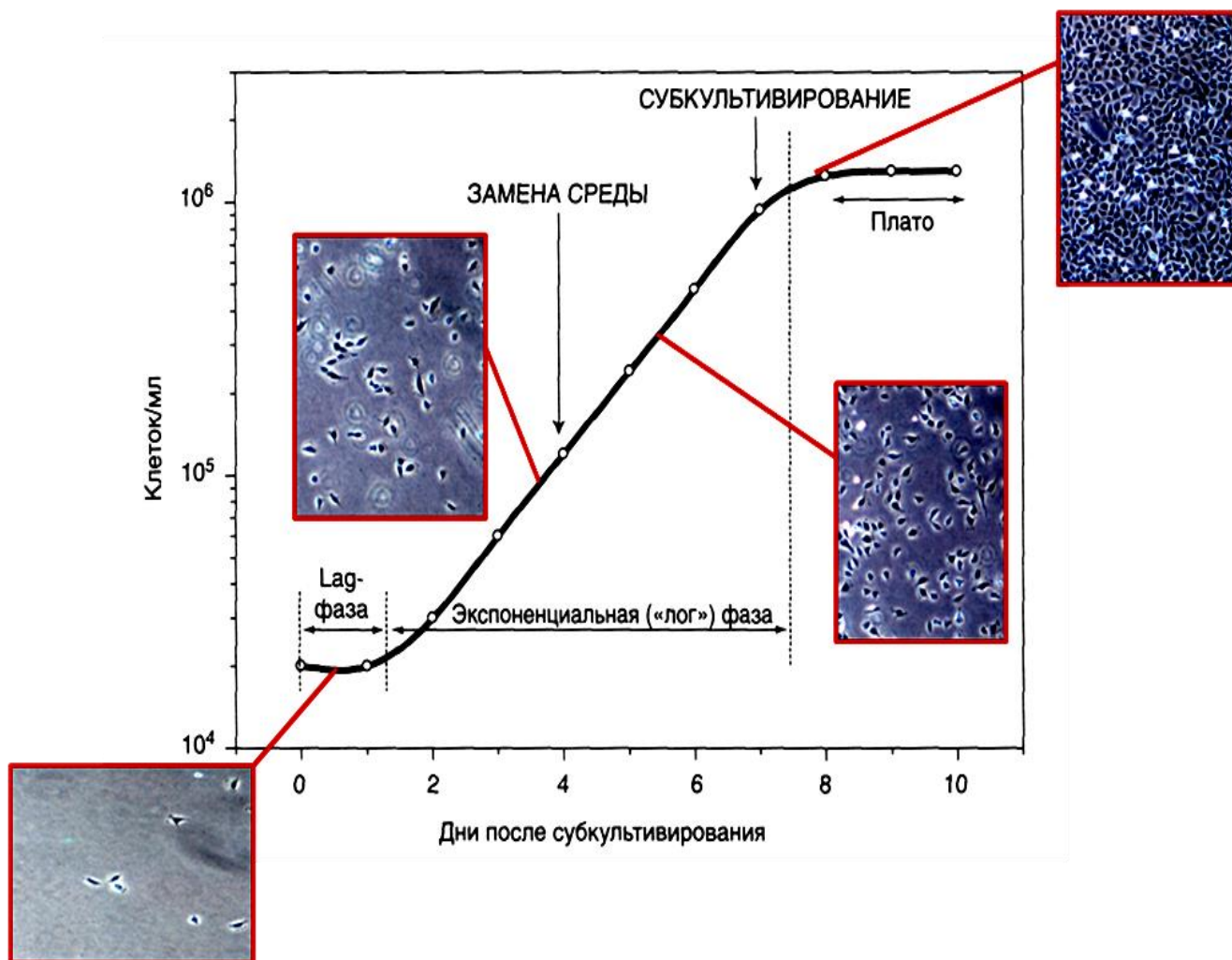


Рис. 2 Кривая роста и поддержания культуры (Фрешни, 2010)

При выращивании клеток, из-за постоянного деления может возникнуть их переизбыток в культуре. В результате чего могут возникнуть следующие проблемы:

- накопление в питательной среде продуктов выделения, в том числе токсичных,
- накопление в культуре омертвевших клеток, прекративших жизнедеятельность,
- избыточное количество клеток оказывает негативное влияние на клеточный цикл, рост и деление замедляются, а клетки начинают стареть и отмирать (контактное ингибирование роста).

Для поддержания нормального функционирования культур клеток, а также для предотвращения негативных явлений периодически проводят замену питательной среды а также пересадку клеток – пассирование. Пассаж (субкультивирование) – процедура переноса части активно пролиферирующей клеточной культуры в другой культуральный сосуд со свежей питательной средой. Субкультивирование обычно включает в себя (рис. 3.):

- 1) удаление истощенной питательной среды,
- 2) диссоциацию клеток монослоя при помощи трипсина или некоторых других гидролитических ферментов (слабоприкрепленные культуры можно отделить от дна флакона простым встряхиванием),
- 3) разведение клеток в новом флаконе и свежей среде.

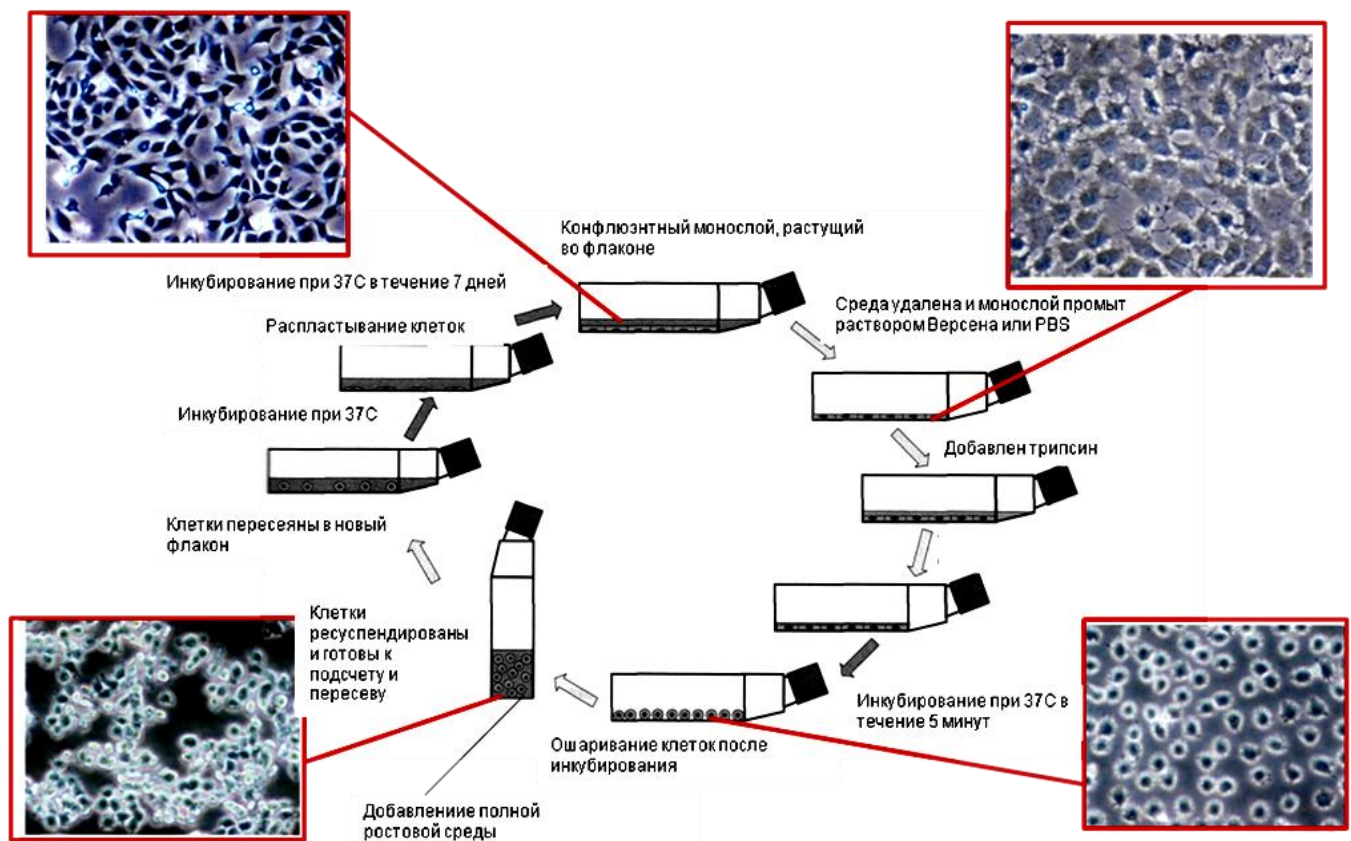


Рис.3 Субкультивирование монослойной культуры клеток (Фрэшни, 2010)

Подсчет клеток осуществляют при помощи камеры Горяева. Это предметное стекло, с бороздами и нанесённой микроскопической сеткой.

Размеры малых делений клетки сетки составляют 0,05 мм, а больших – 0,2 мм. При этом сетка нанесена на площадку (участок стекла), расположенный на 0,1 мм ниже, чем две соседние площадки. Эти площадки служат для притирания покровного стекла. В результате объем жидкости над квадратом, образованным большими делениями сетки Горяева, составляет 0,004 микролитра. Существует много способов подсчета количества клеток, наиболее распространен и прост следующий. Под микроскопом подсчитывают общее количество клеток над 25 заштрихованными малыми квадратами (рис.4) на сетке камеры (N) и вычисляют по формуле:

$$C = N \times 10^4 \times V, \text{ где}$$

N – количество клеток в заштрихованных квадратах,

V – объем суспензии клеток, мл.

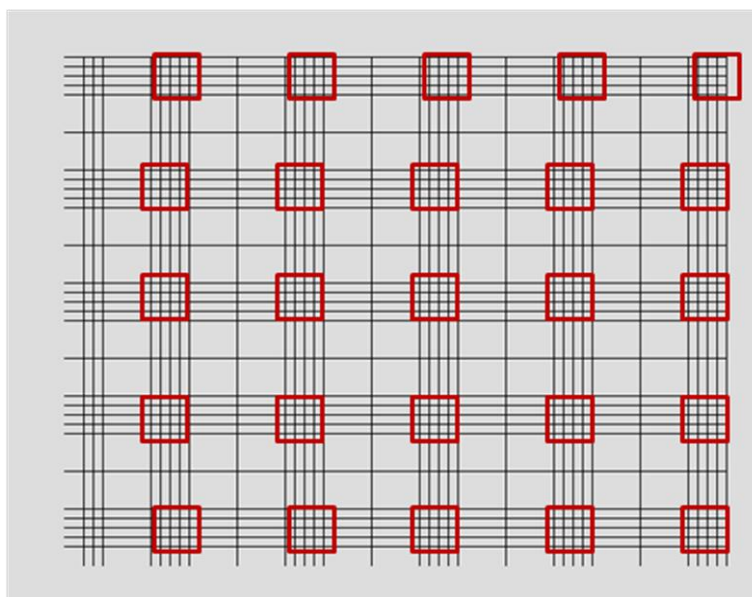


Рис. 4 План сетки камеры Горяева

Красным выделены квадраты, в которых считается количество клеток

В работе используется клеточная линия Chang Liver, которая была получена в 1954 г. R.S. Chung из ткани нормальной печени человека. Клетки адаптированы к размножению в среде MEM с 10% телячьей сывороткой, интенсивно используются в вирусологических, биохимических и онкологических исследованиях. Клетки синтезируют белки, свойственные

печеночным клеткам человека (в частности – щелочную фосфатазу печеночного типа). Морфология клеток – эпителиоподобная.

Материалы и оборудование

1. Клеточная культура Chang Liver, 3-5 день после посева при концентрации $1,5 \times 10^5$ клеток/мл, флаконы 25 см², 5 шт.
2. Полная питательная среда, приготовленная в ходе предыдущей работы, 20 мл
3. Центрифуга настольная (выполняющая от 500 до 2500 оборотов/мин.)
4. Культуральные флаконы 25см², 5 шт.
5. Камера Горяева, 2 шт.
6. Дозаторы различного объема (0,2 мл, 1,0 мл, 5,0 мл)
7. Наконечники различного объема (0,2 мл, 1,0 мл, 5,0 мл)
8. Пробирки центрифужные с завинчивающейся крышкой объема 15 мл, 5 шт.
9. Раствор 0,25% трипсина, приготовленный в ходе предыдущей лабораторной работы, 5 мл
10. Раствор PBS, приготовленный в ходе предыдущей работы 50 мл
11. Этанол 70% 0,5 л
12. Пинцеты лабораторные, 2 шт.
13. Тампоны ватные
14. Емкость для слива
15. Карандаш, блокнот для записей

Выполняемые процедуры

1. Подготовить ламинарно-поточный шкаф к работе, а после выполнения всех упражнений – к выключению, выполнить необходимые асептические процедуры.

2. Снять клетки с поверхности культурального флакона.
3. Подсчитать клетки в пересеваемой культуре.
4. Перенести часть клеточной культуры концентрацией 2×10^4 клеток/см² в новый флакон.

Ход работы

1. Выполнить подготовку и выключение ламинарно-потокowego шкафа в соответствии с процедурами предыдущего занятия. В ходе работы выполнять асептические процедуры по внесению, размещению и использованию предметов в зоне ламинарно-потокowego шкафа в соответствии с процедурами предыдущего занятия. Выполнять требования стерильности при манипуляции с флаконами, дозаторами, наконечниками в соответствии с процедурами предыдущего занятия.
 - 2.1. Слить отработанную среду дозатором в емкость для слива.
 - 2.2. Промыть клетки раствором PBS. Для этого залить 2 мл раствора в культуральный флакон, покачать или аккуратно «пропипетировать» несколько раз, слить раствор в емкость для слива. Процедуру повторить 2 раза.
 - 2.3. Снять клетки с поверхности флакона раствором трипсина. На дно флакона нанести 0,5 мл р-ра трипсина, инкубировать при 37⁰С в течение 5 минут – для отделения клеток от культуральной поверхности. Пронаблюдать завершение трипсинизации с помощью микроскопа – появление округлившихся клеток, плавающих в растворе, и визуально – помутнение раствора.
 - 2.4. Остановить реакцию трипсинизации добавлением полной ростовой среды. Добавить в культуральный флакон с клетками 1 мл полной ростовой среды.
 - 2.5. Пипеткой полностью собрать клетки и перенести суспензию клеток в центрифужную пробирку, промыть флакон раствором PBS и перенести

смыв в ту же центрифужную пробирку. Центрифугировать в течение 5 минут при 1000 об/мин (200 g). По окончании центрифугирования аккуратно слить надосадочную жидкость, добавить 3 мл полной ростовой среды, тщательно «распипетировать» до образования гомогенной суспензии одиночных клеток.

3.1. Подсчитать количество клеток в полученном растворе в камере Горяева. Подготовить камеру (камера должна быть чистой и сухой). Аккуратно и не нажимая притереть к поверхности покровное стекло до появления радужных полосок по краям. Нанести на боковую поверхность камеры 100 мкл клеточной суспензии. Поместить камеру под микроскоп (увеличение 10X) и подсчитать количество клеток в 25 заштрихованных квадратах (N) на двух полях камеры, найти значение N_{cp} . Подсчитать количество клеток в растворе.

4.1. Рассадить клетки в новые культуральные флаконы из расчета 2×10^4 кл/см². На основании полученных результатов рассчитать объем суспензии V_1 , содержащий заданное количество клеток, перенести в новый культуральный флакон и добавить полной ростовой среды до необходимого количества 5 мл. Подписать флакон, поместить в CO₂-инкубатор.

Расчеты

В ходе выполнения работы записывать выполняемые расчеты и заполнять таблицу данных.

Полученные результаты

1. Записать последовательность действий при выполнении всех процедур.
2. Рассчитать объем суспензии, содержащий 2×10^4 кл/см² (V_1).
3. Рассчитать объем полной ростовой среды, добавленный до 5 мл (V_2).
4. Представить заполненную таблицу и выполненные расчеты под ней.

Основные данные, полученные при выполнении лабораторной работы

| Количество клеток в двух полях камеры Горяева (N_1, N_2) | Среднее значение N (N_{cp}) | Количество клеток в растворе (C) | Объем суспензии, содержащий 2×10^4 кл/см ² (V_1) | Объем полной ростовой среды, добавленный до 5 мл (V_2) |
|--|-----------------------------------|--------------------------------------|--|--|
| $N_1 =$ | $N_{cp} =$ | $C =$ | $V_1 =$ | $V_2 =$ |
| $N_2 =$ | | | | |

Вопросы по теме

1. Что такое адгезивная клеточная культура?
2. Опишите процесс роста адгезивной культуры внутри одного культурального сосуда.
3. Опишите основные манипуляции при пассажировании адгезивной культуры.
4. Что такое камера Горяева. Опишите процедуру подсчета клеток в соответствии с изученной формулой.

Вопросы для самостоятельного изучения

1. Какие еще ферменты, кроме трипсина, используются при снятии клеток с культуральных флаконов?
2. Опишите три класса трансмембранных белков, обеспечивающих адгезию клеток к поверхности.

Лабораторная работа 5

Методы окраски клеточной культуры

Цель работы: изучить технику прижизненной и препаратной окраски клеток.

Теоретическая часть

Препаратная окраска клеточных культур (срезов тканей). В основе окрашивания клеток и тканей лежат физико-химические процессы (диффузия, адсорбция, абсорбция, растворимость и др.), происходящие как в красителе, так и в микроструктурах. Большое значение имеют плотность ткани и дисперсность красителя, которые определяют последовательность и скорость окрашивания.

Целью окрашивания является более отчетливое выявление различных компонентов клеток и тканей. Некоторые красители обеспечивают этот эффект, растворяясь в выявляемых компонентах, например нейтральных жирах. Другие красители вызывают химическую реакцию, например выявление железа с образованием берлинской лазури в кислой среде. Во многих случаях процесс окрашивания возможен только при наличии протравы, например гематоксилин окрашивает ткань в присутствии солей металлов.

Ранее окрашивание было возможно только в случае мертвых тканей, т. к. живые клетки совершенно не красятся, а могут лишь накапливать краски. Поэтому клетки должны быть предварительно законсервированы или зафиксированы, т. е. умерщвлены, но так, чтобы по возможности не нарушить естественных морфологических соотношений и не вызвать грубых артефактов.

В настоящее время разработано множество прижизненных красителей, которые позволяют не только окрашивать структуры живых клеток, но и наблюдать динамику внутриклеточных процессов.

Универсальных фиксаторов, одинаково пригодных для любых целей, не существует. Выбор фиксирующего раствора основывается на его

преимуществах и недостатках для работы с конкретным видом материала и пригодностью для конкретного метода микроскопического исследования. Для фиксации культур клеток наиболее распространены фиксаторы на основе формальдегида, спиртов (этанол, метанола), пикриновой кислоты, ацетона.

В гистологической практике применяют основные, кислотные и нейтральные красители.

Основные, или ядерные, красители – это основания или их соли, которые окрашивают структуры кислой природы (хроматин ядер, ядрышко и др.) и называются базофильными (гематоксилин, тионин, кармин, метиловый зеленый и др.). Окрашивание ядер клеток обусловлено двумя механизмами химического взаимодействия: 1) основные красители, например анилиновые, образуют соли в присутствии ДНК и РНК; 2) образуются комплексы с ионами металлов при применении протравы. В практической работе чаще используют протравные красители. К ним относятся гематоксилин, кармин, сафранин, галлоцианин, ализарин.

Кислотные красители – это кислоты или их соли, с помощью которых выявляют вещества и структуры основной природы (цитоплазматические структуры клеток, эритроциты и т.д.). Таковыми являются эозин, кислый фуксин, конго красный (конгорот), эритрозин. Окрашивание цитоплазмы клеток происходит в результате связывания оснований и белков кислотными красителями. В группу диффузных (кислых) красителей входят карбоновые и сульфоновые кислоты, нитро-, азокрасители и др. В гистологической практике постоянно применяют эозины, пикриновую кислоту, кислый фуксин, конго красный (конгорот), азокармин, эритрозин. Чаще используют 1%-е водные растворы этих красителей, но можно применять и 1%-й спиртовой раствор. Продолжительность окрашивания составляет 3-5 мин в зависимости от сорта и серии красителя. Если препарат переокрашивается, то излишек краски легко удаляется при ополаскивании в дистиллированной воде и последующем обезвоживании препарата или среза в спиртах.

Окраска фиксированных гистологических препаратов как основными, так и кислотными красителями представляет собой процесс адсорбции, тесно связанный с электрическим зарядом ткани.

Существуют также нейтральные красители: судан III, судан IV, метиленовый синий.

Процесс гистологического окрашивания можно условно разделить на несколько типов: прогрессивный и регрессивный, прямой и непрямой, простой и сложный.

Прогрессивной окраской называют такую, при которой после красочной ванны препарат имеет уже окончательную степень окраски, т.е. достигается интенсивное проникновение красителя в ткань.

Регрессивная окраска – при которой объект сначала приобретает чрезмерно плотное окрашивание, которое затем ослабляют до желаемого тона. Протекает в две стадии:

- 1) интенсивное и равномерное перекрашивание всего объекта;
- 2) дифференцировка препарата, которая заключается в удалении из среза излишней краски.

Если раствор красителя непосредственно действует на ткань, то говорят о прямом окрашивании. Окрашивание после предварительной подготовки ткани (протравливания) называется непрямым. Протравами служат окислы двух – и трехвалентных металлов (железа, алюминия, хрома и других). При окрашивании протравы с красителями образуют хелатный комплекс (лак), который заметно отличается от взятого красителя. Протрава в отдельных случаях может превратить вещество в краситель. Так, например, гематоксилин в чистом виде почти не обладает красящими свойствами, тогда как его лаки становятся сильными красителями.

Окрашивание одним красителем – простое, а при использовании нескольких красителей – сложное.

В рутинной работе для окраски клеток (для выявления их морфологии, топографии и т.д.) наиболее часто применяется гематоксилин-эозиновое окрашивание.

Гематоксилин – краситель растительного происхождения (рис. 1). Содержится в форме гликозида в соке кампешевого дерева (*Haematoxylon campechianum*), произрастающего в Индии и Америке. Гематоксилин сам не является красителем, но, окисляясь, превращается в красящий гематеин (рис. б). Все рецепты приготовления гематоксилина для окрашивания препаратов имеют своей целью превращение гематоксилина в гематеин. Этот процесс происходит в результате окисления гематоксилина путем отдачи 2 атомов водорода, называется «созревание» красителя (3-4 недели на свету с доступом воздуха). Сильные окислители (йодноватистый калий, перманганат калия, перекись водорода) ускоряют процесс.

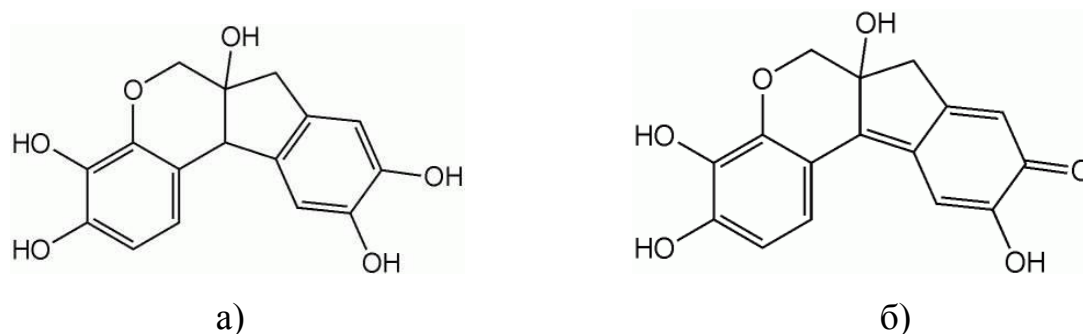


Рис.6 Химическая формула гематоксилина (а) и гематеина (б)

Гематеин не способен давать окрашивание без протрав, с которыми он образует солеобразное соединение – лак. В качестве протрав используют соли алюминия, железа, меди, хрома, молибдена, ванадия.

Эозин – (тетрабромфлюоресцеин) – красный кислый краситель, получаемый в результате реакции брома с флюоресцеином и флюорохром зеленовато-желтого цвета (рис.7). Растворим в воде и этаноле и применяется для окраски цитоплазмы и ее структур. В практике существует множество

модификаций гематоксилин-эозинового окрашивания. Наиболее часто клетки окрашивают с использованием гематоксилина Эрлиха.

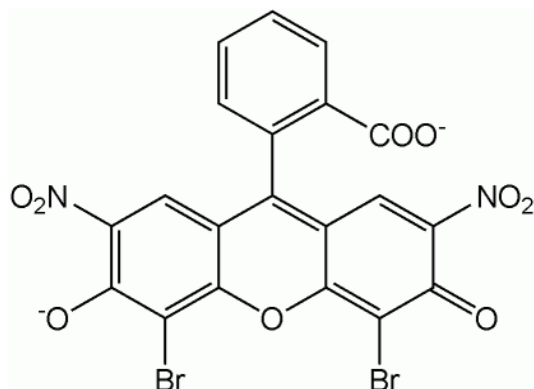


Рис.7 Химическая формула эозина В

При окраске гематоксилином Эрлиха соблюдается следующая очередность манипуляций:

- 1) клетки (срезы тканей) фиксируют на подложке.
- 2) Клетки перекрашивают в свежeproфильтованном гематоксилине Эрлиха в течение 3-20 минут в зависимости от степени зрелости красителя и его красящей силы.
- 3) Промывают в водопроводной воде 2-3 минуты и более.
- 4) Переносят в солянокислый спирт (0,5-1% HCl на 70% спирте) и дифференцируют в нем от 3-5 до 30 секунд и более, смотря по степени закрашивания. Срез во время дифференцировки краснеет. Излишне длительная задержка срезов в солянокислом спирте ведет к полному извлечению краски.
- 5) Выдерживают в проточной водопроводной воде с целью нейтрализовать кислоту и подсинить ядра, ставшие красноватыми после кислоты, что достигается в щелочной среде. Посинения ядер можно добиться, оставляя срезы в теплой водопроводной воде на продолжительное время (на 15-20 минут и больше). Если желают получить резко синие ядра, промывную воду со срезами искусственно подщелачивают нашатырным спиртом (3-5 капель нашатырного спирта на 0,5 л водопроводной воды). В искусственно подщелоченной воде срезы синют очень быстро, после чего их переносят в другую чашку со свежей

водопроводной водой для отмыывания от щелочи на 30 мин и дольше (до 24 часов). Тщательное отмыывание необходимо, иначе срез плохо воспримет эозин.

б) Подсиненные и тщательно отмытые срезы в дальнейшем извлекают из чистой промывной воды, докрашивают эозином, споласкивают в воде, обезвоживают, просветляют, заключают в бальзам. При такой окраске с дифференцировкой препараты получаются более контрастными и яркими, синие и темные ядра резко выделяются на чистом розовом фоне.

Таким образом, клеточные культуры и срезы тканей обрабатывают для получения обзорных препаратов.

Витальная (прижизненная) окраска клеточных культур. Красители, пригодные для прижизненного окрашивания, называются витальными. Окраска живых клеток дает возможность выявлять изменения, происходящие в клетках и тканях при разных внешних воздействиях. В последнем случае чрезвычайно важно то, что количество красителя, поглощенного неповрежденными или поврежденными путем какого-либо воздействия клетками, можно точно определить и выразить количественно. Разница в количестве красителя, поглощенного неповрежденными и поврежденными клетками, свидетельствует о характере и степени изменений, возникающих под влиянием различных внешних воздействий.

В отличие от препаратных, витальные красители обладают дополнительными свойствами: низкой токсичностью и способностью легко проникать в живые клетки и их структуры через клеточные оболочки и цитоплазматические мембраны. По оптическим свойствам различают витальные красители для видимого света и флуоресцентные красители (флуорохромы). По химическим свойствам различают основные и кислотные (кислые) витальные красители. В основных красителях хромофорная группа связана с катионом (нейтральный красный, метиленовый синий). В кислотных хромофорная группа связана с анионом (феноловый красный, цианол). Проникая в клетки животных, одни красители диффузно окрашивают

цитоплазму, другие красители откладываются в виде гранул в области комплекса Гольджи, оставляя ядро и цитоплазму неокрашенными.

Метод витальной окраски с использованием трипанового синего (рис.8) – это контроль за состоянием проницаемости плазматической мембраны клеток.

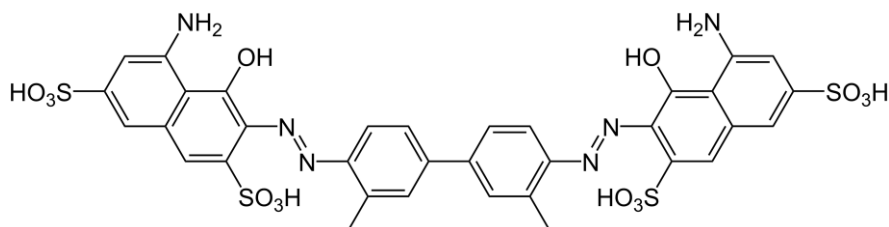


Рис. 8. Химическая формула трипанового синего

Неповрежденные мембраны непроницаемы для трипанового синего при кратковременной инкубации; при этом даже небольшие включения красителя в цитозоле свидетельствуют о нарушении интактности клеточной мембраны. Для визуальной оценки повреждения клеток используется способность ядерных белков адсорбировать краску. Даже самое слабое окрашивание ядра является индикатором повреждения клеточной мембраны. Метод очень прост и дает возможность без специального оборудования получить ответ в течение нескольких минут. Тем не менее, тест на трипановый синий, по-видимому, недостаточно чувствителен для выявления незначительных повреждений плазматической мембраны. Это связано с тем, что краситель проникает в клетки и окрашивает их лишь тогда, когда плазматическая мембрана становится проницаемой для высокомолекулярных соединений, например белков, и не может идентифицировать более ранние нарушения ее селективности, когда она становится доступной для низкомолекулярных соединений.

При окраске трипановым синим соблюдается следующая очередность манипуляций:

- 1) Суспензию живых клеток смешивают со свежепрофильтрованным 0,5% раствором трипанового синего в PBS.

2) Полученный раствор переносят в камеру Горяева и выполняют подсчет количества окрашенных и неокрашенных клеток в 25 заштрихованных квадратах (стандартным способом). Жизнеспособность клеток (ЖК) определяют по формуле:

$$\text{ЖК} = (1 - (N_1 : N_2)) \times 100 \%, \text{ где}$$

ЖК – жизнеспособность клеток (%),

N_1 – количество окрашенных клеток,

N_2 – общее количество клеток.

3) Количество жизнеспособных клеток на 1 мл культуры определяют по формуле:

$$C = N_3 \times 10^4 \times R, \text{ где}$$

C- количество жизнеспособных клеток (кл/мл)

N_3 – жизнеспособные неокрашенные клетки,

R = 1,1 – коэффициент разведения при подсчете в камере Горяева.

В силу своей простоты и достаточно высокой воспроизводимости метод окрашивания клеток трипановым синим общепринят как обязательный экспресс-метод оценки жизнеспособности клеточных культур.

Ход работы

Материалы и оборудование для выполнения гематоксилин-эозинового окрашивания с использованием гематоксилина Эрлиха

1. Клеточная культура Chang Liver, 3-5 день после посева на покровные стекла при концентрации $1,5 \times 10^5$ клеток/мл,
2. 6-ти луночные планшеты, 2 шт.
3. 4% водный раствор параформальдегида, 10 мл
4. Фосфатно-солевой буфер (PBS) pH 7,4
5. Реактив гематоксилина Эрлиха, 20 мл
6. Раствор эозина, 20 мл

7. Солянокислый спирт, 20 мл
8. Теплая водопроводная вода, 1 л
9. Дистиллированная вода, 1 л
10. Планшеты 6-ти луночные нестерильные, 7 шт.
11. Пипетки Пастера одноразовые, на объем 2 мл, 20 шт.
12. Глицерин, 10 мл
13. Предметные стекла, 7 шт.
14. Пинцеты лабораторные, 7 шт.
15. Тампоны ватные
16. Емкость для слива
17. Карандаш, блокнот для записей

Материалы и оборудование для выполнения витального окрашивания с использованием трипанового синего

1. Клеточная культура Chang Liver, 3-5 день после посева при концентрации $1,5 \times 10^5$, клеток/мл, флаконы 25 см², 5 шт.
2. Полная питательная среда, приготовленная в ходе предыдущей лабораторной работы, 7 мл
3. Раствор 0,25% трипсина, приготовленный в ходе предыдущей лабораторной работы (размороженный), 5 мл.
4. Раствор PBS, приготовленный в ходе предыдущей лабораторной работы, 50 мл.
5. Раствор трипанового синего 0,5% в PBS, 2 мл
6. Камера Горяева
7. Пробирки на объем 2 мл
8. Дозаторы различного объема (0,2 мл, 1,0 мл, 5,0 мл)
9. Наконечники различного объема (0,2 мл, 1,0 мл, 5,0 мл)
10. Этанол 70%, 0,5 л.
11. Пинцеты лабораторные, 2 шт.

12. Тампоны ватные
13. Емкость для слива
14. Карандаш, блокнот для записей

Выполняемые процедуры

1. Выполнить гематоксилин-эозинное окрашивание клеточной культуры, адгезированной на покровных стеклах с использованием гематоксилина Эрлиха в нестерильных условиях.
2. Выполнить витальное окрашивание с использованием трипанового синего в асептических условиях.

Ход работы

- 1.1. Покровное стекло с выросшими на нем клетками аккуратно поместить в лунку 6-ти луночного планшета клетками вверх.
- 1.2. Промыть клетки раствором PBS. Для этого добавить в лунку 3 мл раствора, покачать планшет и слить раствор. Внесение и слив раствора выполнять разными пипетками. Процедуру повторить 3 раза.
- 1.3. Внести в лунку с промытыми клетками 1,5 мл раствора параформальдегида, выдержать 10 минут. Слить раствор.
- 1.4. Промыть клетки раствором PBS 3 раза по 2 мл.
- 1.5. Промыть клетки дистиллированной водой 6 раз по 2 мл.
- 1.6. Внести в лунку с промытыми клетками 1 мл раствора гематоксилина на 15 минут.
- 1.7. Промыть клетки водопроводной водой 6 раз по 2 мл (или пока вода не перестанет окрашиваться).
- 1.8. Внести в лунку с промытыми клетками 1 мл солянокислого спирта на 10 секунд.

- 1.9. Промыть клетки водопроводной водой 7 раз по 2 мл.
- 1.10. Промыть клетки дистиллированной водой 3 раза по 2 мл.
- 1.11. Внести в лунку с промытыми клетками 1 мл раствора эозина на 3 минуты.
- 1.12. Промыть клетки дистиллированной водой 3 раза по 2 мл (или пока вода не перестанет окрашиваться).
- 1.13. На предметное стекло нанести глицерин в виде полосы.
- 1.14. Аккуратно пинцетом достать предметное стекло с окрашенным препаратом клеток из лунки планшета и аккуратно положить его стороной с клетками на полоску глицерина, наклоняя от одного края к другому.
- 1.15. Рассмотреть полученный препарат окрашенных клеток в световой микроскоп при различных увеличениях (доступных в модели используемого микроскопа).
- 2.1. Выполнить подготовку и выключение ламинарно-поточного шкафа в соответствии с процедурами предыдущего занятия. В ходе работы выполнять асептические манипуляции по внесению, размещению и использованию предметов в зоне ламинарно-поточного шкафа в соответствии с процедурами предыдущего занятия. Все манипуляции проводить в ламинарно-поточном шкафу.
- 2.2. Выполнить снятие клеток с культурального флакона в соответствии с процедурами предыдущего занятия.
- 2.3. В раствор трипсина с клетками добавить 4,5 мл полной ростовой среды, тщательно ресуспендировать.
- 2.4. В две пробирки внести по 0,5 мл полученной суспензии клеток. В одну добавить 0,5 мл полной ростовой среды, а в другую 0,5 мл 70% этанола. Инкубировать в условиях CO₂-инкубатора 10 минут.
- 2.5. Клеточную суспензию после инкубации тщательно ресуспендировать и перенести в другую пробирку по 0,5 мл из каждой. К взятым 0,5 мл клеточной суспензии добавить 0,1 мл раствора трипанового синего, ресуспендировать.
- 2.6. 100 мкл полученного окрашенного раствора нанести на подготовленную камеру Горяева и выполнить подсчет количества окрашенных и неокрашенных

клеток стандартным способом в соответствии с правилами, освоенными на предыдущем занятии.

Расчеты

В ходе выполнения работы во витальном окрашивании клеток записывать выполняемые расчеты и заполнять таблицу данных.

Таблица 8

Основные данные, полученные при выполнении лабораторной работы

| Вариант воздействия на клетки | Количество во клетках в сетке камеры Горяева | N₁ окрашенные клетки, шт. | N₃ неокрашенные клетки, шт. | N₂ общее количество во клетках, шт. | ЖК, % | C, кл/мл |
|--------------------------------------|---|---|---|---|--------------|-----------------|
| Без обработки спиртом | Сетка 1 | | | | | |
| | Сетка 2 | | | | | |
| | N_{cp} | N_{1 cp=} | N_{3 cp=} | N_{2 cp=} | | |
| С обработкой спиртом | Сетка 1 | | | | | |
| | Сетка 2 | | | | | |
| | N_{cp} | | | | | |

Полученные результаты

- 1.1. Записать последовательность действий при выполнении всех процедур при окраске гематоксилин-эозином.
- 1.2. Зарисовать 3-4 клетки окрашенного препарата при максимальном увеличении.
- 1.3. Описать увиденные окрашенные структуры.
- 2.1. Записать последовательность действий при выполнении всех процедур при окраске трипановым синим.
- 2.2. Представить преподавателю заполненную таблицу и расчеты под ней.

2.3. Сделать вывод о влиянии 70% этанола на жизнеспособность клеток.

Вопросы по теме

1. Для чего необходимо препаратное и витальное окрашивание клеток?
2. Приведите классификацию и примеры основных групп препаратных красителей.
3. Что является красящим веществом в составе гематоксилина Эрлиха?
4. Опишите достоинства и недостатки витальной окраски с использованием трипанового синего.

Вопросы для самостоятельного изучения

1. Опишите принцип метода иммуноцитохимической окраски клеток.
2. Дайте характеристику основных групп флуорохромов, используемых для витальной окраски клеток.
3. Опишите достоинства и недостатки использования генетически кодируемых флуоресцентных белков при витальной окраске клеток.

Лабораторная работа 6

Клонирование клеток

Цель работы: изучить технику клонирования клеток монослойной культуры с использованием планшетов для микротитрации.

Теоретическая часть

Клон – группа клеток, происходящая из одной клетки-предшественника путем многократного деления. Получение клонов отдельных клеток является традиционным подходом исследователей к решению проблемы гетерогенности популяции клеток. Метод эффективно применяется в отношении постоянных клеточных линий, а для конечных культур его эффективность снижена, поскольку эти клетки могут пройти ограниченное количество делений, и к тому времени, когда клон может продуцировать достаточное количество клеток, он может находиться на стадии старения.

Метод клонирования эффективно используется для оценки выживания клеток, оптимизации условий роста культуры, для определения химио- и радиочувствительности.

Самый распространенный и эффективный метод клонирования – разведение клеточной культуры до крайне низкой плотности, когда при выращивании в определенных условиях вокруг единичной клетки возникает группа ее потомков, не смешивающихся с потомками соседней. Такую отдельную группу можно извлечь микроманипуляциями (вручную или с использованием специальной аппаратуры).

При использовании метода в большинстве случаев выживаемость клеток снижается, так как клетки посеяны при низкой посевной концентрации. В этих условиях клеткам требуется большее количество питательных веществ в связи с их потерей при утечке через мембрану. Также существует предположение, что

сигнальные молекулы, выделяемые клетками (факторы кондиционирования), которые присутствуют в культурах с высокой плотностью, в культурах низкой плотности либо отсутствуют, либо имеют низкую концентрацию. Для решения проблемы улучшения выживаемости клеток при клонировании в практике используются несколько подходов.

Обогащение условий культивирования. Использование насыщенных полных ростовых сред – с увеличенным содержанием сыворотки (до 30%), с добавлением факторов роста, гормонов, промежуточных метаболитов. Обработка поверхности культуральных сосудов для улучшения адгезии клеток (используется полилизин, коллаген, матригель и др.).

Использование кондиционированной среды – среды, которая использовалась для роста других клеток этой же линии и содержит метаболиты, факторы роста и продукты матрикса, оставшиеся от этих клеток. Такие среды добавляют в питательные среды для культивирования единичных клеток.

Использование фидерных слоев клеток – клеток с подавленной пролиферативной активностью, на сформировавшийся монослой которых высевают сильноразведенные клоногенные культуры. Таким образом имитируются факторы окружающей среды, соответствующие нормальной плотности посева клеток. В качестве фидерного слоя часто используются клетки постоянных линий, пролиферативная активность которых полностью подавляется по достижении монослоя. В таком состоянии клетки могут существовать 2-3 недели, и за это время поддерживать растущие клоны.

Можно выделить два основных подхода к получению изолированных колоний из отдельных клеток. Первый – выращивание отдельных клонов в планшетах для микротитрации, когда каждая клетка находится в отдельной ячейке и колонии могут быть изолированы для дальнейшей работы трипсинизацией отдельных ячеек. Второй – выращивание отдельных клонов в общем объеме – например, в чашке Петри, - и тогда применяются различные способы для изолирования растущих колоний с последующим механическим извлечением.

Материалы и оборудование

1. Клеточная культура Chang Liver, 3-5 день после пересева в концентрации $1,5 \times 10^5$ клеток/мл, флаконы 25 см², 5 шт.
2. Основная питательная среда MEM, 10 мл.
3. Полная питательная среда, 20 мл.
4. Раствор 0,25% трипсина, 5 мл.
5. Раствор PBS, 50 мл.
6. Планшеты для микротитрации 96-ти луночные, 5 шт.
7. Раствор коллагена IV-го типа из крысиных хвостов в 0,33 М уксусной кислоте, 10 мл.
8. Дозаторы различного объема (0,2 мл, 1,0 мл, 5,0 мл).
9. Наконечники различного объема (0,2 мл, 1,0 мл, 5,0 мл).
10. Пробирки центрифужные с завинчивающейся крышкой объема 15 мл, 5 шт.
11. Пробирки типа Эппендорф, 5 шт.
12. Этанол 70%, 0,5 л.
13. Пинцеты лабораторные, 2 шт.
14. Тампоны ватные.
15. Емкость для слива.
16. Карандаш, блокнот для записей.

Выполняемые процедуры

1. Выполнить посев клеток при низкой (клоногенной) плотности в 96-ти луночные планшеты.
2. Инкубировать до образования колоний. Оценить эффективность выполненного клонирования.

Ход работы

1. Выполнить подготовку и выключение ламинарно-поточного шкафа в соответствии с процедурами предыдущего занятия. В ходе работы выполнять асептические манипуляции по внесению, размещению и использованию предметов в зоне ламинарно-поточного шкафа в соответствии с процедурами предыдущего занятия. Все манипуляции проводить в ламинарно-поточном шкафу.
2. Обработать поверхность лунок 96-ти луночного планшета раствором коллагена. Стерильный раствор коллагена разлить в 30 лунок планшета по 50 мкл на лунку, поместить в CO₂-инкубатор и оставить на 24 часа. Удалить из лунок избыток раствора коллагена, промыть лунки основной ростовой средой, внося в лунки 40 мкл среды и удаляя до тех пор, пока среда перестанет изменять цвет (минимум 2 раза).
3. Выполнить снятие клеток с культурального флакона в соответствии с процедурами предыдущего занятия.
4. В раствор трипсина с клетками добавить 4,5 мл полной ростовой среды, тщательно ресуспендировать.
5. Клеточную суспензию тщательно ресуспендировать, 100 мкл суспензии нанести на подготовленную камеру Горяева и выполнить подсчет количества клеток в 1 мл стандартным способом в соответствии с правилами, освоенными на предыдущих занятиях.
6. Приготовить серию разведений растворов с понижающейся концентрацией клеток. Из полученной суспензии приготовить 1 мл суспензии с концентрацией 50 000 клеток на 1 мл. Этот раствор будет первым в серии разведений (P1). Выполнить последующие разведения (P2, P3, P4) в соответствии с приведенной ниже таблицей 9. Перед отбором клеток из каждого раствора обязательно тщательно ресуспендировать его, поскольку клетки опускаются на дно пробирки.

Получение суспензии клеток низкой концентрации

| Параметры | P1 | P2 | P3 | P4 |
|--------------------------------------|--------|-------|-----|-----|
| Объем предыдущего раствора, мл | | 0,5 | 0,2 | 0,6 |
| Объем добавленной среды, мл | | 4,5 | 4,8 | 3,4 |
| Концентрация клеток в 1 мл | 50 000 | 5 000 | 200 | 30 |
| Разведение предыдущего раствора, раз | | 10 | 25 | 6,7 |

В результате проведенных разведений получить 4 мл суспензии с концентрацией 30 клеток/мл.

7. Выполнить посев клеток из суспензии с низкой концентрацией в 30 подготовленных лунок планшета. В каждую лунку поместить по 100 мкл полученной суспензии.

8. Подписать планшет и поместить в CO₂-инкубатор.

9. Наблюдать за состоянием клеток в планшете в течение 10 дней. Отметить лунки, цвет среды в которых стал изменяться (желтеть). На 11-й день подсчитать количество лунок с изменившимся цветом ростовой среды. Подсчитать количество колоний клеток в каждой отмеченной лунке.

Расчеты

1. Записать расчет количества клеток с помощью камеры Горяева
2. Записать расчет получения 1 мл суспензии клеток с концентрацией 50000 клеток/мл (P1).
3. По итогам выполнения работы заполнить таблицу данных.

Основные данные, полученные при выполнении лабораторной работы

| Лунки с прикрепившимися клетками | Количество образовавшихся колоний, шт. |
|----------------------------------|--|
| Пример записи: А1, В2, С4 и т.д. | |

4. Подсчитать количество лунок с единичными колониями.
5. Оценить эффективность клонирования (ЭК, %) по формуле:

$$\text{ЭК} = P/P_1 \times 100\%, \text{ где}$$

P – количество засеянных лунок

P₁ – количество лунок с единичной колонией.

Полученные результаты

1. Записать последовательность действий при выполнении всех процедур.
2. Представить заполненную таблицу и расчеты под ней.

Вопросы по теме

1. Что такое метод клонирования и для чего он используется?
2. Что такое кондиционированная среда?
3. Как на практике повышают выживаемость клеток, при посеве с низкой посевной концентрацией?
4. Опишите два основных способа получения изолированных колоний.

Вопросы для самостоятельного изучения

1. Опишите два основных способа получения фидерных слоев клеток.
2. Опишите процедуру клонирования суспензионной культуры клеток (основные отличия от монослойной).

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Льюин Б. Клетки. М.: Бином. Лаборатория знаний, 2010. 951 с
2. Фрешни Р. Культура животных клеток. М.: Бином. Лаборатория знаний, 2010. 691 с.
3. Уилсон К., Уолкер Дж. Принципы и методы биохимии и молекулярной биологии. М.: Бином. Лаборатория знаний, 2014. 848 с.
4. Сельскохозяйственная биотехнология и биоинженерия: учеб. для студентов вузов, обуч. по сельскохоз., естеств.-науч. и пед. специальностям/ под ред. В.С. Шевелухи. М.: ЛЕНАНД, 2015. 704с.
5. Свищев Г.М. Конфокальная микроскопия и ультрамикроскопия живой клетки. М.: Физматлит, 2011. 120 с.
6. Плескова С.Н. Атомно-силовая микроскопия в биологических и медицинских исследованиях. Долгопрудный: Интеллект, 2011. 184 с.

Елена Игоревна Черкасова
Анна Александровна Брилкина

РАБОТЫ С КУЛЬТУРАМИ КЛЕТОК

Учебно-методическое пособие

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
**“Национальный исследовательский Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского”**

603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23.

Подписано в печать Формат 60×84 1/16.

Бумага офсетная. Печать офсетная. Гарнитура Таймс.

Усл. печ. л. 3,6. Уч.-изд. л.

Заказ № . Тираж .

Отпечатано в типографии Нижегородского университета

Им. Н.И. Лобачевского

603600, г. Нижний Новгород, ул. Большая Покровская, 37

Лицензия ПД № 18-0099 от 14.05.01